

## HIV-1 整合酶真核表达载体的构建及在 HeLa 细胞中的表达和定位

谷万港<sup>1)</sup>, 张丽<sup>2)</sup>, 张旋<sup>3)</sup>

(1) 遵义医学院基础医学院免疫学教研室, 贵州遵义 563000; 2) 昆明医科大学学报编辑部; 3) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 构建重组基因表达载体 pcDNA6/V5-HisA-IN 并观察其在 HeLa 细胞中的表达. 对 HIV-1 整合酶表达以后在细胞里的定位情况进行研究. **方法** 通过 PCR 扩增和定向克隆技术构建重组真核表达载体 pcDNA6/V5-HisA-IN. 以 Lipofectamine2000 介导转染 HeLa 细胞. 细胞用 4% 的多聚甲醛固定以后, 经过 PI 对细胞核染色, 整合酶抗体跟整合酶反应以后, 用 FITC 标记的二抗进行孵育, 用共聚焦显微镜观测整合酶在细胞中的表达情况. **结果** 经过定向克隆和测序鉴定证实, 重组真核表达载体 pcDNA6/V5-HisA-IN 构建成功. 免疫荧光实验显示, Lipofectamine2000 介导质粒转染 HeLa 表达成功, 整合酶主要定位在细胞核. **结论** HIV-1 整合酶真核表达载体构建成功, 转染以后, 整合酶表达并且主要定位在细胞核.

**[关键词]** HIV-1; 整合酶; 细胞核; FITC

**[中图分类号]** Q939.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 09 - 0042 - 04

## Construction of Eukaryotic Expression Vector with HIV-1 Integrase for Expression in HeLa Cells

GU Wan-gang<sup>1)</sup>, ZHANG Li<sup>2)</sup>, ZHANG Xuan<sup>3)</sup>

(1) Dept. of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563000; 2) Editorial Department of Kunming Medical University; 3) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct recombinant eukaryotic expression vector for EGFP fused HIV-1 integrase expression. **Methods** Wild type of HIV-1 integrase gene was cloned into eukaryotic expression vector-pcDNA6/V5-HisA. After restricted enzyme mapping, PCR confirmation and sequence confirmation, the recombinant plasmid was transfected into HeLa cells with Lipofectamine2000. After 24 hours, the expression of integrase was examined by immunofluorescence with confocal fluorescent microscopy. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde. The cell nuclei were stained with Propidium Iodide (PI). Then the expression was imaged and analyzed with Confocal Microscopy. **Results** The integrase expressed significantly in HeLa cells in 24 hours after transfection. Integrase was expressed and localized into nuclei mainly. After fixed with 4% paraformaldehyde, the cell nuclei were stained with PI. When nuclei were showed in red in normal cells, the nuclei with integrase over expression turned yellow or orange. **Conclusion** The construction of eukaryotic expression vector of integrase was successful. Integrase was expressed and localized into nuclei mainly after transfection in HeLa cells.

**[Key words]** HIV-1 integrase; Eukaryotic expression vector; The nuclei; FITC

HIV-1 整合酶 (Integrase) 可以催化前病毒整合进入人类基因组, 而整合进入人类基因组是病毒利用人类细胞机制完成其自身的复制和增殖的

第一步, 也是整个病毒感染周期的关键步骤<sup>[1,2]</sup>. 有研究表明, 除了催化病毒 cDNA 插入人类基因组以外, 整合酶还在病毒复制周期中发挥其他的功

---

**[作者简介]** 谷万港 (1979~), 男, 山东淄博市人, 医学博士, 副教授, 主要从事病毒免疫学研究.

**[通讯作者]** 张旋. E-mail: [snoopykm@126.com](mailto:snoopykm@126.com)

能, 比如把病毒的 cDNA 转运到细胞核等<sup>[3-6]</sup>. 整合酶有 3 个结构域, N 末端结构域 (1-50 碱基), 催化核心结构域 (51-212 碱基), C 末端结构域 (213-228 碱基)<sup>[7]</sup>. 其中, 催化核心结构域含有核定位信号 (NLS), 通过与细胞因子 LEDGF/P75 等的相互作用, 整合酶会定位到细胞核<sup>[8]</sup>. 本研究构建了整合酶真核表达载体, 并对整合酶蛋白表达和定位进行分析.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及仪器

引物, 100 bp DNA Marker, streptomycin penicillin, FBS, DMEM 培养基, 琼脂糖和 PBS 购自 Invitrogen 公司. T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 NEB 公司. Ampli Taq Golden 聚合酶购自 Roche 公司. High Pure<sup>TM</sup> PCR Product Purification Kit 购自 Boehringer Mannheim 公司. QIAquick gel extraction kit, QIAprep Spin Miniprep kit, Plasmid Midi Kit 购自 QIAGEN 公司. pcDNA6/V5-HisA 购自 Invitrogen 公司. 整合酶抗体是 Santa Cruz 产品. Leica SP5 共聚焦显微镜是徕卡公司的产品.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 HIV-1 整合酶的基因克隆及 pcDNA6/V5-HisA-IN 重组表达载体结构** HIV-1 整合酶基因克隆自有整合酶基因的质粒 pEGFP-C1-IN (本实验室贮存). 上游引物: 5'-CAGCGTAAGCTTATGTTT-TTAG-ATGGAATAGATAAG (Hind III). 下游引物: 5'-GTGGATCTCGAGTTAATCCTCATCCTGTCTACT-TGC (Xho I).

50  $\mu$ L 反应体系中进行 PCR 反应, 循环条件设置如下: 95 $^{\circ}$ C 3 min 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min 1 个循环; 4 $^{\circ}$ C 维持. 用 Hind III 和 Xho I 分别对载体 pcDNA6/V5-HisA 和外源 DNA 双酶切, 纯化后连接, 构建 pcDNA6/V5-HisA-IN 质粒. pcDNA6/V5-HisA-IN 质粒转化感受态细菌 DH5 $\alpha$ , 用含有 Amp 抗性的 LB 培养基筛选质粒. 质粒的提取用 QIAprep Spin Miniprep kit 完成, 用 Hind III 和 Xho I 双酶切后凝胶电泳观察目的片段 IN 长度后并送 Tech Dragon Limited 公司进行序列测定. 质粒的大量提取用 QIAGEN Plasmid Midi Kit 完成.

**1.2.2 细胞培养** HeLa 培养液为 DMEM, 添加 10% 的 FBS, 1% of streptomycin-penicillin. 转染前 24 h 进行细胞传代, 使细胞在转染时处于对数生

长期. 转染后 6 h 内用不含抗生素的培养基培养.

**1.2.3 整合酶在 HeLa 细胞中的表达** pcDNA6/V5-HisA-IN 质粒体外扩增后利用 Lipofectamin2000 介导质粒载体导入 HeLa 细胞. 分别以 DMEM 无血清培养基稀释 8  $\mu$ g DNA 和 7.5  $\mu$ L Lipofectamine2000, 转染 6 孔板培养的 HeLa 细胞, 转染按照产品手册进行. 转染以后, 继续培养 24 h, 用 4% 的多聚甲醛固定细胞, 用 0.5% Triton X-100 处理细胞 15 min. PBS 漂洗以后, 37 $^{\circ}$ C 用 3% 的 BSA 孵育 1 hr, PBS 漂洗, 整合酶抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, FITC 标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次. 用 Leica SP5 共聚焦显微镜观察蛋白的表达情况. 用 PI 染色指示细胞核.

## 2 结果

### 2.1 表达载体 pcDNA6/V5-HisA-IN 的构建

经过 PCR, 酶切, 连接和转化, HIV-1 整合酶基因成功克隆到 pcDNA6/V5-HisA. 以重组质粒为模板进行 PCR 鉴定, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果发现, 在对应 Marker 约 900 bp 处可见一条特异性条带, 与预期产物大小 (870 bp) 符合, 说明 PCR 扩增的目的片段与整合酶重组质粒长度一致, 初步判定整合酶重组真核表达载体构建成功 (见图 1). 将重组质粒送 Tech Dragon Limited 进行测序, 结果跟整合酶基因序列一致,

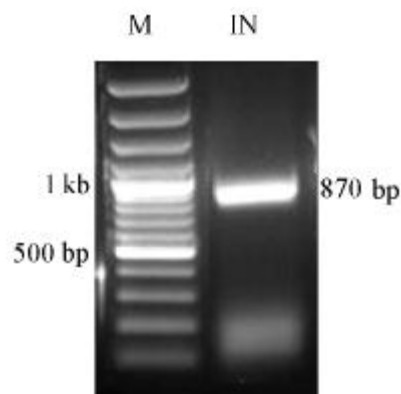


图 1 表达载体 pcDNA6/V5-HisA-IN PCR 鉴定结果

### Fig. 1 The identification of expression vector pcDNA6/V5-HisA-IN by PCR

重组真核表达载体 pcDNA6/V5-HisA-IN 经 PCR 鉴定, 电泳可见一条特异性条带, 大小约为 900 bp, 与预期大小 (870 bp) 符合, 初步判定重组真核载体构建成功. M: DNA Marker; IN: 整合酶.

表明 pcDNA6/V5-HisA-IN 重组质粒构建成功。

## 2.2 整合酶在 HeLa 细胞中的表达和定位

转染 24 h 以后,用特异性整合酶抗体和 FITC 标记的二抗对整合酶的基因表达进行检测。结果显示,在细胞核可见强的绿色荧光信号,细胞浆内绿色应该信号弱,提示整合酶蛋白主要定位在细胞核(图 2A)。用 PI 染色以后,细胞核被染成

红色,细胞核可见强的红色荧光信号(图 2B)。绿色标示的整合酶跟红色的细胞核重叠后呈现橙色或者黄色,而未表达融合蛋白的细胞,细胞核呈现红色,细胞其他部分没有荧光信号(图 2C)。结果表明,笔者构建的 HIV-1 整合酶真核表达载体可成功转染 HeLa 细胞,转然后整合酶表达并且主要定位在细胞核。

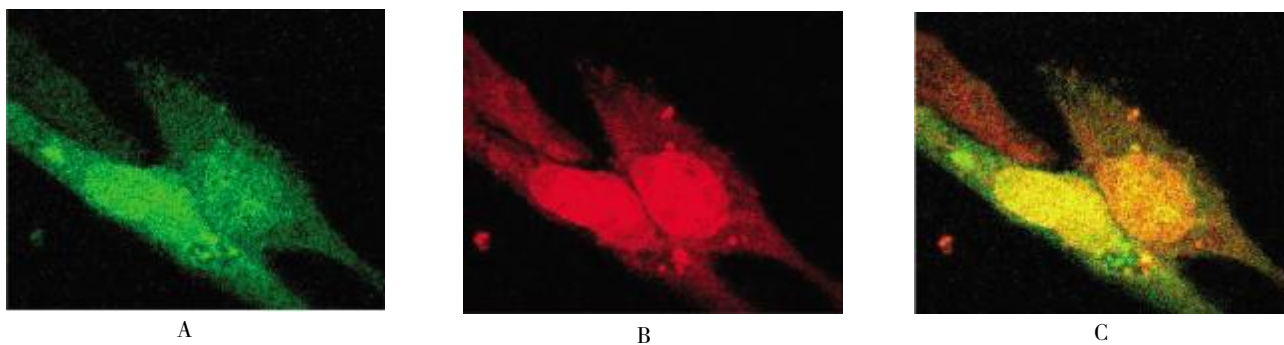


图 2 整合酶在 HeLa 细胞中的表达

Fig. 2 Expression of integrase in HeLa cells

整合酶蛋白主要定位在细胞核(绿色荧光),图 2A。PI 染色后,细胞核呈红色(图 2B)。绿色标示的整合酶跟红色的细胞核重叠,呈现橙色或者黄色,而未表达融合蛋白的细胞,细胞核呈现红色,细胞其他部分无荧光(图 2C)。

## 3 讨论

自从 1981 年首次报道以来, HIV 已经造成了数千万人的感染。现在最有效的治疗方法是鸡尾酒疗法(HAART)<sup>[9,10]</sup>。鸡尾酒疗法需要多种药物针对不同靶点开展治疗。然而,由于 HIV 的高变异率,耐药株不断出现。许多患者在治疗上面临无药可选的尴尬局面。HIV 的复制依赖于 3 个主要的酶:逆转录酶,蛋白酶和整合酶<sup>[11]</sup>。这 3 个酶一直是抗 HIV 药物研究的热点,由于宿主细胞内不存在整合酶类似物,因此整合酶已成为设计、筛选抗 HIV 药物的理想靶点。鉴于整合酶作为新兴药物靶点的广阔前景,整合酶的研究引起了广泛关注。第一个整合酶抑制剂 MK-0518 于 2007 年被 FDA 批准上市<sup>[12,13]</sup>。

作为催化前病毒整合进人类基因组的关键酶,整合酶带有核定位信号<sup>[14]</sup>。研究发现,整合酶与多个人类细胞因子发生相互作用,形成一个整合前复合体,该复合体实现从细胞质到细胞核的转位,使整合酶进入细胞核,靠近染色体,从而完成整合的步骤<sup>[15]</sup>。在这个过程中, LEDGF/p75 起到关键作用<sup>[16]</sup>。研究发现,在靶细胞里过表达 LEDGF/p75 的 IBD (integrase binding domain) 可以抑制病毒的复制<sup>[17,18]</sup>。而无法与 LEDGF/p75 相互作用的缺陷型

病毒突变体,复制能力大幅降低<sup>[19]</sup>。

本研究中,构建了 HIV-1 整合酶真核表达载体,转染 HeLa 细胞以后, FITC 标记的整合酶主要定位在细胞核。经过 PI 染色以后,细胞核用红色表示,绿色荧光标记的整合酶在细胞核大量聚集,与红色的细胞核重叠,而细胞其他区域则相对表达量很低。这些结果表明,整合酶的表达是成功的。这个表达系统对研究整合酶的生物学性质提供了平台。另外,整合酶的核转位作为新的靶点,已经在抑制剂的开发领域引起了广泛的关注。该系统可以用于整合酶抑制剂的筛选工作,这对于抗 AIDS 的新药开发具有积极的意义。

### [参考文献]

- [1] BUSSCHOTS K, VOET A, DE MAEYER M, et al. Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase [J]. *J Mol Biol*, 2007, 365 (5): 1 480 - 1 492.
- [2] ENGELMAN A, CHEREPANOV P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4 (3): 1 000 046.
- [3] ASTIAZARAN P, BUENO M T, MORALES E, et al. HIV-1 integrase modulates the interaction of the HIV-1 cellular cofactor LEDGF/p75 with chromatin [J]. *Retrovirology*, 2011, 8: 27.

- [4] MCNEELY M, HENDRIX J, BUSSCHOTS K, et al. In vitro DNA tethering of HIV-1 integrase by the transcriptional coactivator LEDGF/p75 [J]. *J Mol Biol*, 2011, 410 (5): 811 – 830.
- [5] EMILIANI S, MOUSNIER A, BUSSCHOTS K, et al. Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (27): 25 517 – 25 523.
- [6] MAILLOT B, LEVY N, EILER S, et al. Structural and Functional Role of IN1 and LEDGF in the HIV-1 Preintegration Complex [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): 60 734.
- [7] HAYOUKA Z, LEVIN A, MAES M, et al. Mechanism of action of the HIV-1 integrase inhibitory peptide LEDGF 361–370 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394 (2): 260 – 265.
- [8] VANEGAS M, LLANO M, DELGADO S, et al. Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (8): 1 733 – 1 743.
- [9] CHIBWESHA C J, GIGANTI M J, PUTTA N, et al. Optimal time on HAART for prevention of mother-to-child transmission of HIV [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2011, 58 (2): 224 – 228.
- [10] LOULERGUE P, DELAUGERRE C, JULLIEN V, et al. HIV drug resistance on HAART despite an undetectable viral load [J]. *Curr HIV Res*, 2012, 9 (8): 623 – 624.
- [11] ENGELMAN A, CHEREPANOV P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10 (4): 279 – 290.
- [12] EVERING T H, MARKOWITZ M. Raltegravir (MK-0518): an integrase inhibitor for the treatment of HIV-1 [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2007, 43 (12): 865 – 877.
- [13] ANKER M, CORALES RB. Raltegravir (MK-0518): a novel integrase inhibitor for the treatment of HIV infection [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17 (1): 97 – 103.
- [14] MAERTENS G, CHEREPANOV P, DEBYSER Z, et al. Identification and characterization of a functional nuclear localization signal in the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (32): 33 421 – 33 429.
- [15] VANDEGRAAFF N, DEVROE E, TURLURE F, et al. Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication [J]. *Virology*, 2006, 346 (2): 415 – 426.
- [16] TINTORI C, VELJKOVIC N, VELJKOVIC V, et al. Computational studies of the interaction between the HIV-1 integrase tetramer and the cofactor LEDGF/p75: insights from molecular dynamics simulations and the informational spectrum method [J]. *Proteins*, 2010, 78 (16): 3 396 – 3 408.
- [17] MEEHAN A M, SAENZ D T, MORRISON J H, et al. LEDGF/p75 proteins with alternative chromatin tethers are functional HIV-1 cofactors [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5 (7): 1 000 522.
- [18] MEEHAN A M, SAENZ D T, MORRISON J, et al. LEDGF dominant interference proteins demonstrate prenuclear exposure of HIV-1 integrase and synergize with LEDGF depletion to destroy viral infectivity [J]. *J Virol*, 2011, 85 (7): 3 570 – 3 583.
- [19] ZHENG Y, AO Z, JAYAPPA K D, et al. Characterization of the HIV-1 integrase chromatin- and LEDGF/p75-binding abilities by mutagenic analysis within the catalytic core domain of integrase [J]. *Virol J*, 2010, 84(7): 68.

(2013-06-13 收稿)